

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-183799

(43)Date of publication of application : 16.07.1996

(51)Int.Cl. C07K 16/18
C12N 5/10
C12P 21/08
G01N 33/53
G01N 33/577
// C12N 15/02
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 07-185272 (71)Applicant : NISSHIN FLOUR MILLING CO
LTD

(22)Date of filing : 21.07.1995 (72)Inventor : YANAIHARA NOBORU
SATOU TAKEYA
FUKUCHI KIYOSHI

(30)Priority

Priority number : 06266567 Priority date : 31.10.1994 Priority country : JP

(54) MONOCLONAL ANTIBODY OF HUMAN GLICENTIN, HYBRIDOMA PRODUCING THE
ANTIBODY AND DETERMINATION OF HUMAN GLICENTIN USING THE ANTIBODY

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the subject new antibody
recognizing the C-terminal region of human glicentin and
using an amino acid sequence at a specific site of
human glicentin as a recognition site, effective for the
determination of human glicentin in high sensitivity and
useful for the diagnosis of diabetes, etc.

CONSTITUTION: This new monoclonal antibody
recognizing the C-terminal region of human glicentin
having the total or a part of the 51st to 69th amino acids
from the N-terminal of human glicentin as the recognition

Arg Ser Leu Gly Asp Thr Glu Glu Lys Ser Arg Ser Phe Ser Ala Ser His
Ala Asp Pro Leu Ser Asp Pro Asp Glu Met Asn Glu Asp Lys Arg His Ser
Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala
Glu Asp Thr Val Gln Ser Leu Ser Asp Ser His Arg Arg Arg Asn Arg Thr

site can be produced by producing a recombinant human glicentin of formula using E.coli, adsorbing the glicentin to a polyvinyl pyrrolidone in such a manner as to be expressed in a state close to a natural-type human glicentin, mixing with Freund's complete adjuvant, injecting the mixture to BALB/c mouse by subcutaneous injection, collecting the spleen cell after booster immunization, fusing the cell with a mouse-originated myeloma cell, culturing on HAT medium to obtain hybridoma, screening the antibody-producing strain, cloning by limiting dilution analysis and culturing the produced cell.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-183799

(43) 公開日 平成8年(1996)7月16日

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	P I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/18		8318-4H		
C 1 2 N 5/10	Z N A			
C 1 2 P 21/08				
		9281-4B	C 1 2 N 5/ 00	Z N A B
		9162-4B	15/ 00	C
			審査請求 有	請求項の数 7 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-185272

(22) 出願日 平成7年(1995)7月21日

(31) 優先権主張番号 特願平6-266567

(32) 優先日 平6(1994)10月31日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000226998

日清製粉株式会社

東京都中央区日本橋小網町19番12号

(72) 発明者 矢内原 昇

静岡県富士宮市聚倉2480番地の1 株式会社

社矢内原研究所内

(72) 発明者 佐藤 岳峻

埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡5丁目3番1号

日清製粉株式会社医薬研究所内

(72) 発明者 福地 清

東京都中央区日本橋小網町19番12号 日清

製粉株式会社内

(74) 代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 ヒトグリセチンのモノクローナル抗体、この抗体を産生するハイブリドーマおよびそれを用いるヒトグリセチンの定量法

(57) 【要約】

【課題】 ヒトグリセチンに対するモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマとヒトグリセチンの定量法の提供。

【解決手段】 ヒトグリセチンで免疫感作させた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて得られるハイブリドーマ 3 D 5 A から目的のモノクローナル抗体が得られる。このようにして得られるヒトグリセチンのC末端領域を認識するモノクローナル抗体を固相化し、ヒトグリセチン検体と反応させ、さらに固相化した抗体とはヒトグリセチンのアミノ酸配列の末端認識部位を異にする抗体であって標識化されたものを反応させることにより、ヒトグリセチン含有検体中のヒトグリセチンを感度よく定量することができる。

(2)

特開平 8-183799

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒトグリセリンの N 末端から 51 番目から 69 番目のアミノ酸の全部または一部を認識部位とするヒトグリセリンの C 末端領域を認識するモノクローナル抗体。

【請求項 2】 ヒトグリセリンの N 末端より 51 番目から 62 番目のアミノ酸の全部または一部を認識部位とする請求項 1 に記載されたヒトグリセリンに対するモノクローナル抗体。

【請求項 3】 ヒトグリセリンの N 末端より 51 番目から 69 番目のアミノ酸の全部または一部を認識部位とするヒトグリセリンの C 末端領域を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 3D5A (FERM P-14575)。

【請求項 4】 抗ヒトグリセリン抗体を固相化し、これにグリセリン含有の検体を反応させ、次にはじめに固相化した抗ヒトグリセリン抗体とはヒトグリセリンアミノ酸配列の領域認識部位を異にする標識化された抗ヒトグリセリン抗体を反応させ、この反応した標識化された抗ヒトグリセリン抗体の量を測定することからなる、ヒトグリセリンの定量法において、この固相化した抗ヒトグリセリン抗体と標識化された抗ヒトグリセリン抗体のいずれか 1 つが請求項 1 または 2 に記載のヒトグリセリンの C 末端領域を認識するモノクローナル抗体に由来するものであることを特徴とするヒトグリセリンの定量法。

【請求項 5】 標識化された抗ヒトグリセリン抗体として、酵素で標識化された抗ヒトグリセリン抗体を用いる請求項 4 に記載されたヒトグリセリンの定量法。

【請求項 6】 標識化された抗ヒトグリセリン抗体として、まずビオチンで標識化された抗ヒトグリセリン抗体を用い、次にそのビオチンで標識化された抗ヒトグリセリン抗体を、アビジンまたはストレプトアビジンの結合した酵素で標識を行なう請求項 4 に記載されたヒトグリセリンの定量法。

【請求項 7】 標識化された抗ヒトグリセリン抗体として、放射性同位元素で標識化された抗ヒトグリセリン抗体を用いる請求項 4 に記載されたヒトグリセリンの定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒトグリセリンに対するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、およびヒトグリセリンに対する抗体を用いる定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】 動物の膵臓中のランゲルハンス島 A 細胞から分泌され、肝臓などの細胞膜のアデニル酸シクラーゼ系を活性化することが知られている 29 個のアミノ酸残基から構成されるポリペプチドホルモンであるグルカ

2

ゴンの研究から、Sundby, F. はブタ小腸抽出物よりグルカゴン抗体に対する抗原性を有する大分子量のポリペプチドを単離し、これをグリセリンと命名した (Sundby, F. et. al., Horm. Metab. Res., Vol. 8, 366~371 (1976))。続いて Thim, L. および Moody, A. J. はその構造決定を行なってこのグリセリンが 69 個のアミノ酸残基から構成され、その 33~61 番のアミノ酸配列はグルカゴンと同一の配列であることを説明した (Regulatory Peptides, Vol. 2: 139 (1981))。また、グリセリンのアミノ酸配列には種差が存在し、その後ヒトグリセリンのアミノ酸配列はヒトプレログルカゴンの DNA 配列より推定された。

【0003】 近年、本発明者らは遺伝子組換え技術を用いてヒトグリセリンの生産を行い (特開平 5-334126 号等参照)、それを用いた研究から、インスリン分泌を促進する作用を見いだした (特開平 6-80584 号参照)。また、さらにはヒトグリセリンは小腸粘膜の重畳と絨毛長を増加させることも見出している (特開平 5-326698 号参照)。

【0004】 そこで、ヒトグリセリンと糖尿病または消化器疾患との関連を解明、理解するために、またはそれら疾患の診断のためにヒトグリセリンを良好な感度で、かつ他のグルカゴン類縁物質と区別して特異的に定量することは、医学上非常に重要である。そこで、ヒトグリセリンに対する抗原認識部位の異なる抗体を組み合わせるにより、グリセリンのみを特異的に定量する事が試みられている。この試みの一つに本出願人の出願に係る特開平 5-23196 号に記載の方法が提案されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 上述の特開平 5-23196 号に記載の発明においては、遺伝子組換え技術を用いて得られたヒトグリセリンをマレイミド法あるいはグルタルアルデヒド法等の方法でキャリアー例えば Keyhole Limpet ヘモシアニン (以下、「KLH」という) との結合体にし、フロイントアジュバントと混合し、そしてこのようにして得られた免疫原を用いてヒトグリセリンの C 末端領域を認識する抗体が開示されている。この場合のキャリアーとしてアルブミンのようなタンパク質も用いられる。しかしながら、得られた抗体はヒトグリセリンに対する結合反応性が、必ずしも満足のいくものではなかった。

【0006】 さらには、特開平 5-23196 号においてはペプチド合成法を用いてアミノ酸 7 残基のヒトグリセリン C 末端断片 (63-69) を合成し、この合成断片に、グルタルアルデヒドを用いてキャリアーとしての KLH を結合させて免疫原に用いている。この断片は次のアミノ酸配列を有する。

【0007】 Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala

【0008】 しかしながらこの場合、免疫感作に用いた

(4)

特開平 8-183799

5

疫感染された動物の脾臓細胞と骨髄腫細胞は、一般的な方法、例えばポリエチレングリコール、センダイウイルス、電気パルス等によって細胞融合することが出来る

【Nature, Vol.256, 495~497(1975) 等参照】。得られたハイブリドーマは、酵素抗体法等によってスクリーニングを行い、限界希釈法によってクローン化される。

【0020】本発明においては、以上のようにして、ヒトグリセニンに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ3D5Aを得た。得られたハイブリドーマ3D5Aは工業技術院生命工学研究所に寄託申請し、平成6年10月6日に受託番号FERM P-14575号として受託された。

【0021】得られたクローンは、生育に適した培地中で培養される。あるいは、例えばブリストンを予め授与したマウスの腹腔内に移植して、モノクローナル抗体を高濃度に含む腹水を採取する。このようにして製造された培養液またはマウス腹水からのモノクローナル抗体は、硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー等によって精製される。

【0022】このようにして得られた抗ヒトグリセニンモノクローナル抗体は、生体中のヒトグリセニン、または抗原として認識される領域を含む他のグルカゴン類似物質を特異的に測定するために極めて適している。

【0023】この抗ヒトグリセニンモノクローナル抗体が得られたことにより、別途作成した、このモノクローナル抗体とヒトグリセニンアミノ酸配列の領域認識部位を異にするポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体とを組み合わせることによって本発明のヒトグリセニンの特異的な定量法が完成された。またこの場合、モノクローナル抗体と抗血清を組み合わせることによっても特異的な測定が行えるのである。

【0024】すなわち、本発明のヒトグリセニンの定量では、二種以上の抗体を組み合わせるエライザ法（ELISA法）およびイムノラジオメトリックアッセイ（IRMA法）などのサンドイッチ法を用いた定量法によりヒトグリセニンを特異的に測定することによって行うことができる。

【0025】この方法において、マイクロプレート、ビーズ等に固相化した抗体に検液を反応させ、固相に結合したヒトグリセニンを、別の抗体を用いた酵素免疫法で測定する。例えば、本発明の抗ヒトグリセニンモノクローナル抗体を固相化したマイクロプレートに、一定量のヒトグリセニンまたは未知量の水性試料（例*

Arg Ser Leu Gln Asp Thr Glu Glu Lys Ser Arg Ser Phe Ser Ala Ser Gln
Ala Asp Pro Leu Ser Asp Pro Asp Gln Met Asn Glu Asp Lys Arg His Ser
Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala
Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Ile
Ala

【0030】本発明者らは、抗原が天然型ヒトグリセニンに近い状態で呈示されるように、ヒトグリセニン

6

*例えば血清、血漿、組織抽出液等）を反応させ、標識した第2の抗体を用いて発色反応、蛍光反応、生物発光および化学発光等の発光反応または放射活性の測定にて定量を行う。また、固相化したヒトグリセニン抗体として本発明の抗ヒトグリセニンモノクローナル抗体以外のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体由来のものを用い、そして標識した第2の抗体に本発明の抗ヒトグリセニンモノクローナル抗体由来のものを用いることもできる。

10 【0026】抗体の固相化は、公知の化学結合法または物理的吸着法等を用いて行う。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、またはN-スクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレートやN-スクシニミジル-2-マレイミドアセテート等を用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩等を用いるカルボジイミド法等の2架橋試薬を用いる方法等があげられる。あるいは、先に被検物質とエпитオプの異なる2種類の抗体を反応させて形成された複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固相化させておいて捕捉することも可能である。

20 【0027】抗体の標識は、抗体にβガラクトシダーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ等の酵素を直接結合する方法がある。あるいは、抗体をビチオンで標識しておいて、次にアビジンまたはストレプトアビジンの結合した酵素を用いることが可能である。または酵素標識した抗体、例えばモノクローナル抗体に対して抗マウスIgG標識抗体を使用することが可能である。さらに、¹²⁵I、¹³¹Iまたは³H等の放射性同位元素で標識した抗体を使用する。

【0028】次に実施例によって本発明を具体的に説明することにするが、この実施例は単に説明のためのもので、これによって本発明が限定されるものと解してはならない。

【0029】

【実施例】

【実施例1】

モノクローナル抗体の作成と特異性の検討

1) 免疫原の調製

大腸菌を用いて生産した組換えヒトグリセニンを用いた。この組換えヒトグリセニンは次のアミノ酸配列を有する。

(5)

特開平8-183799

7

をポリビニルピロリドンに吸着させて用いた。すなわち、ヒトグリセニン3.9mgを100μlの生理食塩水に溶解した後、50%ポリビニルピロリドン（Merck社、Darmstadt, Germany）の生理食塩水溶液3mlを加え、室温にて2時間攪拌してヒトグリセニンをポリビニルピロリドンに吸着させた。次にフロイントコンブリートアシュバント（Carbiochem Behring Diagnostics, La Jolla, CA, U.S.A）3mlを加え、氷浴上で15分間オムニミキサー（Sorvall, Du Pont, France）により攪拌し、マウス4匹に対する免疫用注射液とした。

【0031】2）免疫方法

6週齢のBALB/cマウス雌をエーテル麻酔後、全身をアルコール消毒し、免疫用注射液0.5ml（ヒトグリセニンとして120μg）を皮下の十数箇所注射した。

【0032】初回免疫の3週間後に、免疫用注射液0.25ml（ヒトグリセニンとして60μg）を皮下注射して1回目の追加免疫を行った。さらにその3週間後に2回目の追加免疫を行った。2回目の追加免疫の1週間後に、マウスの尾の先端より採血し、血清中の抗体価の測定をラジオイムノアッセイ（RIA）法により行った。以後の免疫スケジュールも同様として、追加免疫を4回行った。RIA法は以下に述べる方法で行った。

0.14M塩化ナトリウム、0.025Mエチレンジアミン四酢酸（以下、「EDTA」という）、0.5%ウシ血清アルブミン（以下、「BSA」という）、0.02%アジ化ナトリウムを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH7.4）を標準希釈液として用いた。培養上清50μlに標準希釈液0.5mlを加えた後、¹²⁵I-ヒトグリセニン0.1ml（放射活性として5,000cpm）を加えて混和し、4℃で1晩反応させた。次に標準希釈液でそれぞれ調製した正常マウス血清（200倍希釈）0.1mlとヤギ抗マウスIgG血清（10倍希釈）0.1ml、および0.14M塩化ナトリウム、0.02%アジ化ナトリウムを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH7.4）にて溶解した5%ポリエチレングリコール6000 0.5mlを順次加え混和し、4℃で2時間反応させた。遠心分離

（3,000rpm、30分間、4℃）を行い上清を吸引除去後、沈渣の放射活性をγ線カウンター（アロカ社、ARC-1000）にて測定した。最終免疫は、ヒトグリセニンを滅菌生理食塩水にて0.2μg/μlの濃度に調製し、この溶液100μl（ヒトグリセニンとして20μg）を尾静脈より投与した。

【0033】3）培地の調製

RPMI 1640培地450mlにビルビン酸ナトリウム溶液55mg、ペニシリン-ストربتマイシン溶液（ペニシリン10,000単位/ml、ストربتマイシン10,000μg/ml）5ml、0.2M L-グルタミン5ml、0.25M 2-メルカプトエタノール0.25ml、および56℃、30分の処理により補体の不活性化を行ったウシ胎児血

8

清50mlを加えたものを完全培地として使用した。またこの完全培地98mlに50倍濃度のヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン（以下、「HAT」という）溶液2mlを加えたものをHAT培地として使用した。また完全培地98mlに50倍濃度のヒポキサンチン-チミジン（以下、「HT」という）溶液2mlを加えたものをHT培地として使用した。

【0034】PEG溶液は、1.5gのポリエチレングリコール4000に血清無添加のRPMI 1640培地1.5mlを加え、80℃の水浴上で溶解し、60℃の恒温槽に入れて冷ました後、クリーンベンチ内で0.22μmのフィルターを用いて過ろ滅菌したものを用いた。

【0035】4）脾細胞の調製

最終免疫の3日後に無麻酔下、マウスから無菌的に脾臓を取り出した。摘出した脾臓を5mlの完全培地に移し、結合組織を除いた後に新しい培地に移した。ハサミで脾臓に切れ目を入れた後、60メッシュのステンレス製ネットを用いて脾細胞を押し出した。この細胞を過ろし、細胞塊等を除いて細胞浮遊液を得た。これを50mlのプラスチックチューブに移して遠心分離（1,000rpm、3分間）した。遠心分離後、上清を吸引して血清無添加のRPMI 1640培地20mlを加え、遠心分離した後に細胞数が 1×10^6 個/mlになるように血清無添加のRPMI 1640培地にて調製した。

【0036】5）ミエローマ細胞の調製

マウス由来のミエローマP3U1細胞は、血清無添加のRPMI 1640培地に懸濁して遠心分離（1,000rpm、3分間）で集めた後、細胞数が 1×10^6 個/mlになるように血清無添加のRPMI 1640培地にて調製した。

【0037】6）細胞融合

ミエローマ細胞および脾細胞を50mlのプラスチックチューブに細胞数で1:10になるように1mlずつ取り混合した後、遠心分離（1,000rpm、3分間）した。上清を完全に吸引除去し沈殿を軽く弛めた後、37℃に加熱したPEG溶液1mlを約2分間かけてゆっくり加えた。次に完全培地2mlを約5分かけてゆっくり加えた。さらにHAT培地15mlを加えたのち、遠心分離（1,000rpm、5分間）して上清を除き、沈殿をHAT培地20mlで洗った後、脾細胞換算で 1×10^6 個/mlとなるように希釈し24ウェルプレートに1.5ml/ウェルで分注し、5%CO₂、37℃の炭酸ガス培養器にて培養した。

【0038】7）スクリーニング

プレートにまいた細胞は、培養開始後7日目にHAT培地を半量交換した。15日目にHT培地にて半量交換した。17日目にも同様にHT培地にて半量交換した。20日目に完全培地にて半量交換を行い、以後完全培地にて培養した。各ウェルより培養上清を採取し、上記したRIA法により培養上清中の抗体産生の有無を確認し

(6)

特開平8-183799

9

た。抗体の産生が認められたプレート中の細胞は、以下に述べる限界希釈法により選別を繰り返した。

【0039】細胞をピペティングにより浮遊させた後、細胞数が 1×10^4 個/mlになるように完全培地で希釈し、さらに 10^3 個/mlおよび 5×10^2 個/mlになるように完全培地で希釈した。これを予めラット胸腺細胞を加えた96ウェルプレートに 0.1 ml/ウェルずつ加え、炭酸ガス培養器にて培養した。培養上清中の抗体を上記したRIA法にて確認し、各ウェルの培養上清中の抗体の力価がほとんど均一になるまでクローニングを繰り返し、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ3D5Aを得た。

【0040】8) サブクラスの決定

ハイブリドーマ3D5Aにより産生されるモノクローナル抗体のサブソタイプの決定は、クローニング後のハイブリドーマ培養上清より、サイメット社の抗マウスIgGサブクラスセット(MONOA b-1 DTM EIA KIT)を用いたELISA法により行った。その結果は、以下の表1に示す。

【0041】

【表1】

クラス	サブクラス	タイプ
IgG	IgG1	κ

【0042】9) 本発明モノクローナル抗体の調製

得られたハイブリドーマ3D5Aを培養して、 1×10^6 の細胞を1mlの生理食塩水に懸濁し、7~30日前にプリスタン 0.5 mlを腹腔内に投与した雌性BALB/cマウスに腹腔内投与した。マウスの腹部が十分に膨らみ、マウスの活動が低下してきた時点で腹水を採取した。採取した腹水は滅菌したプラスチックチューブに移し、遠心分離($1,000$ rpm, 3分間)を行い細胞を回収した。上清を別のチューブに移し遠心分離($3,000$ rpm, 10分間)を行い、上に浮かんだ脂肪成分を取り除いた。

【0043】抗体を含む腹水に1mlの結合緩衝液(1.5Mグリシン, 3M塩化ナトリウム, pH8.9)を加え、Bio-Rad社製のプロテインAエコンパックカートリッジに吸着させた。未吸着画分を再度カートリッジに吸着させたのち、結合緩衝液 30 mlで洗浄した。次に溶出緩衝液(0.1 Mクエン酸, pH6) 20 mlで溶出した。この溶出液は、 1 Mトリス緩衝液(pH8.0) 1 mlにて直ちに中和した。得られた抗ヒトグリセンチンモノクローナル抗体をモノクローナル抗体3D5Aとした。

【0044】10) 標準曲線の作成

標準曲線の作成は、RIA法を用いて測定した。標準抗原として特開平5-334126号に記載の遺伝子組換

10

ヒトグリセンチンを用い、標準抗原として¹²⁵I-ヒトグリセンチンを、ならびにモノクローナル抗体3D5Aを最終希釈倍率 $56,000$ 倍で使用した。標準希釈液としては、 0.14 M塩化ナトリウム、 0.025 M EDTA、 0.5% BSA、 0.02% アジ化ナトリウムを含む 0.1 Mリン酸緩衝液(pH7.4)を用いた。遊離¹²⁵I-ヒトグリセンチンの分離(B/F分離)はポリエチレングリコール存在下の二抗体法により行った。また検体の測定は一点につき2回ずつ行い、平均をとった。

【0045】すなわち、ガラス製チューブに標準希釈液 0.4 ml、標準希釈液で希釈した標準抗原または試料溶液 0.1 ml、希釈抗グリセンチン抗体溶液 0.1 ml、標準抗原¹²⁵I-ヒトグリセンチン 0.1 ml($5,000$ cpm)を加え混和し、 4°C で1晩反応させた。ついで標準希釈液でそれぞれ調製した正常マウス血清(20 倍希釈) 0.1 mlとヤギ抗マウスIgG血清(10 倍希釈) 0.1 mlおよび、 0.14 M塩化ナトリウム、 0.02% アジ化ナトリウムを含む 0.1 Mリン酸緩衝液(pH7.4)にて溶解した 5% (w/v) ポリエチレングリコール600 0.5 mlを順次加え混和し、 4°C 、2時間反応させた。遠心分離($3,000$ rpm, 30分間、 4°C)を行い上清を吸引除去後、沈渣の放射活性をγ線カウンタ(アロカ社、ARC-1000)にて測定し、結合カウント(B)とした。別に標準希釈液 0.5 ml、希釈抗体溶液 0.1 ml、希釈標準抗原溶液 0.1 mlを混和したもの、および標準希釈液 0.6 ml、希釈標準抗原 0.1 ml混和したものを用意し、同様の操作にて反応し、B/F分離をおこない、各々の放射活性を最大結合カウント

(B₀)、非特異結合カウント(N)とした。標準曲線は、Y軸に(B-N)/(B₀-N)を、X軸に標準抗原濃度をとった。logit-logスケール上に直線回歸した標準曲線は、良好な直線性を示した。結果は図1に示す。

【0046】11) 特異性の検討

本発明により得られたモノクローナル抗体の特異性をグリセンチン関連ペプチドを用いて検討した。グリセンチン関連ペプチドは、ヒトグルカゴン、ヒトグルカゴン(1-18)、ヒトグルカゴン様ペプチド[GLP-1(7-36)-NH₂]、ヒトグリセンチン(63-69)を用い、いずれも標準希釈液で適当な濃度に希釈し、上記のRIA法にて測定した。これから、用量反応曲線を作成し、 50% 阻害活性を示す標準ペプチド濃度を 50% 阻害活性を示すペプチド濃度で除したものをそのペプチドの交差反応性とした。結果は以下の表2に示す。

【0047】

【表2】

(7)

特開平8-183799

11	ペプチド	12	交差反応性 (%)
	ヒトグリセニン		100*
	ヒトグルカゴン (=グリセニン(33-61))		25.7
	ヒトGLP-1(7-36)-NH ₂		0
	ヒトグルカゴン(1-18) (=グリセニン(33-50))		0
	ヒトグリセニン(63-69)		0

* : グリセニンに対する交差反応性を100%と捉えた。

【0048】以上の結果よりモノクローナル抗体3D5AはグリセニンのN末端より51番目より62番目のアミノ酸の一部または全部を認識部位とすること、さらにはGLP-1には殆どあるいは全く反応しないことが分かる。

【0049】〔実施例2〕

ELISA法による測定

1) モノクローナル抗体固相化プレートの調製

ヒトグリセニンのC末端領域を認識するモノクローナル抗体GC-15または3D5Aの1gG分画を50mMリン酸緩衝液(pH7.0)を用いてタンパク質あたり10μg/mlの濃度にする。96穴プレート(メンク社製)の各ウェルあたりこの溶液を50μlずつ分注し、4℃に一晩放置して抗体をプレートに固相化した。PBS(0.01Mリン酸緩衝液、pH7.4、0.15M塩化ナトリウム)でウェルを3回洗浄した後、蒸留水で4倍に希釈したブロックエース(大日本製薬社製)を各ウェルに300μl加え、37℃に2時間放置してブロッキングを行った。

【0050】2) 抗体のビオチン化

ヒトグリセニンのN末端領域を認識するモノクローナル抗体GN4-11gG分画を50mMホウ酸ナトリウム水溶液pH8.6に対して平衡化し、タンパク質あたり1mg/mlの濃度に調製した。この抗体溶液1.5mlを用いてアマーシャム社製ビオチン化キットにより供給者の指示にしたがってビオチン化を行った。反応終了後、反応液を0.1%BSAを含むPBSで平衡化したナップカラム(ファルマシア社製)に通して、抗体を未反応のビオチン化試薬と分離した。調製したビオチン化抗体は、溶液に最終0.01%となるようにチメロザールを加え4℃で保存した。

【0051】3) 測定

上記の方法にしたがって調製したプレートをPBS洗浄を3回繰り返した後、0.1%BSAを含むPBSで精製ヒトグリセニン標品を60ng/mlから0.02ng/mlまで段階希釈して各ウェルに50μlのせて、室温で2時間反応した。再びPBSでよく洗浄した後、BSAを含むPBSで1,200倍に希釈したビオチン化抗体を各ウェルに50μlのせて室温で2時間反応させた。次

に0.05%Tween20を含むPBSでプレートをよく洗浄した後、0.1%Tween20を含むPBSで4,000倍に希釈したストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ(ベクター社製)液を50μl加えて室温に1時間放置した。次に、オルトフェニレンジアミンを0.1Mクエン酸・水酸化カリウム緩衝液(pH4.5)に1mg/mlの濃度に溶解し、最終0.012%となるように過酸化水素水を加えて発色試薬を調製し、プレートを0.05%Tween20を含むPBSでよく洗浄した後、発色試薬を100μl加え、室温で発色させた。等量の2規定硫酸を加えて反応を停止させて、波長490nmの吸光度を測定した。結果を図2に示す。

【0052】〔実施例3〕

IRMA法による測定

1) モノクローナル抗体固相化プレートの調製

実施例1に記載の操作により得られたヒトグリセニンのC末端領域を認識するモノクローナル抗体3D5Aの1gG分画を50mMリン酸緩衝液pH7.0を用いてタンパク質あたり10μg/mlの濃度にする。96穴プレート(メンク社製)の各ウェルあたりこの溶液を200μlずつ分注し、4℃に一晩放置して抗体をプレートに固相化した。精製水にてウェルを3回洗浄した後、蒸留水で4倍に希釈したブロックエース(大日本製薬社製)を各ウェルに300μl加え、37℃に2時間放置してブロッキングを行った。

【0053】2) 抗体のヨード化

ヒトグリセニンのN末端領域を認識するモノクローナル抗体血清NR2をヒトグリセニンを結合したセファロース4Bカラムを用いて精製し、得られた1gG分画を50mMリン酸ナトリウム水溶液pH7.3に対して平衡化し、80μg/0.1mlの濃度に調製した。この抗体溶液にNa^[125I]4μl(14.4MBq)、クロロミンT(1mg/ml)5μlを順次加え室温で10分間反応させた。反応終了後、アスコルビン酸(10mg/ml)5μlおよび10%ヨウ化カリウム5μlを加えることにより行った。精製は、反応液を0.5%BSAを含む0.1Mトリリス塩緩衝液(pH8.5)で平衡化したSephadex[®] G-25(ファルマシア社製)カラム(0.8×25cm)に通して、抗体を未反応のNa^[125I]と分離した。調製

13

した標識抗体は、4℃で保存した。

【0054】3) 測定

上記の方法にしたがって調製したプレートを経験水にて洗浄を3回繰り返した後、10%馬血清、0.14M塩化ナトリウム、0.02%アジ化ナトリウムを含む50mMクエン酸緩衝液(pH5.0)で精製ヒトグリセニン標品を5pMから640pMまで段階希釈したものまたは換体を各ウェルに200μl入れて4℃で8時間以上反応した。再び精製水でよく洗浄した後、10%馬血清、0.02%アジ化ナトリウムを含む50mMクエン酸緩衝液(pH5.0)で100,000cpm/0.2mlに希釈した標識抗体を各ウェルに200μl入れて4℃で16時間以上反応させた。次に精製水でプレートをよく洗浄した後、プレートを乾燥し、固相に結合した放射活性をウエ*

ヒトグリセニン(pM)	n	測定内変動係数 (%)	測定間変動係数 (%)
10	3	3.5	4.8
40	3	4.5	4.7
160	3	3.2	3.0

測定内変動係数および測定間変動係数ともに5%以内であり本測定系が安定であることを示した。

【0056】5) 特異性の検討

上記測定系において標準品であるヒトグリセニンの代わりにヒトオキシントモジュリン、ヒトグルカゴン、ヒトGLP-1(7-36)-アミドを用いて測定を行った。その結果を以下の表4に示す。

【表4】

ペプチド	交叉反応性
ヒトグリセニン	100%
ヒトオキシントモジュリン	0
ヒトグルカゴン	0
ヒトGLP-1(7-36)-NH ₂	0

表4から見られるように、グリセニン関連ペプチドは全く検出されなかったことより、本測定系がヒトグリセニンに特異的であることが示された。

【0057】6) ヒト血漿を用いた添加回収試験

ヒト血漿にヒトグリセニン5、10、40、160pMとなるように添加し、上記方法により測定を行った。その結果を表5に示す。

【表5】

添加グリセニン量(pM)	回収率(%)
5	94.2
10	112.8
40	108.9
160	113.4

検討した濃度範囲において添加回収試験の結果が良好であることを示した。

(8)

特開平8-183799

14

*ル型γカウンターにて測定した。結果を図3に示す。標準曲線はlog-logスケール上において、5~640pMの範囲において良好な直線性を示し、最低検出感度は5pMであった。健康人の血漿中のヒトグリセニン濃度は、従来の測定法から推定により求められているが、30~50pMであると考えられており、本測定系は健康人の血漿中のヒトグリセニン濃度を検出できる良好な感度をもつ系である。

【0055】4) 再現性試験

上記測定系の安定性を調べるために、測定内変動係数および測定間変動係数を調べた。結果を以下の表3に示す。

【表3】

ヒトグリセニン(pM)	n	測定内変動係数 (%)	測定間変動係数 (%)
10	3	3.5	4.8
40	3	4.5	4.7
160	3	3.2	3.0

【0058】7) 希釈試験

ヒト血漿にヒトグリセニン160pMとなるように添加し、10%馬血清、0.14M塩化ナトリウム、0.02%アジ化ナトリウムを含む50mMクエン酸緩衝液(pH5.0)で2倍、4倍と段階希釈したものを、上記3)の測定法により測定を行った。結果を図4に示す。ヒトグリセニン添加血漿の希釈曲線は、標準曲線と平行性を示し、本測定系が血漿中のヒトグリセニンを測定していることが示された。添加回収、希釈試験の結果より本発明のヒトグリセニンの定量法は、ヒト血漿中のヒトグリセニンを特異的に直接測定できることが証明された。

【0059】

【発明の効果】本発明によるハイブリドマ3D5Aを適当な生産用培地を用いて培養して得られた培養液より、または動物の腹腔内に移植して得られた腹水よりモノクローナル抗体を精製する事によって、ヒトグリセニンに対する抗体が安定して得られるようになった。

【0060】さらに本発明によるモノクローナル抗体を組み合わせ、あるいは抗血清と組み合わせることにより、ヒトグリセニンを特異的に、より感度良く検出、定量する事が可能になった。

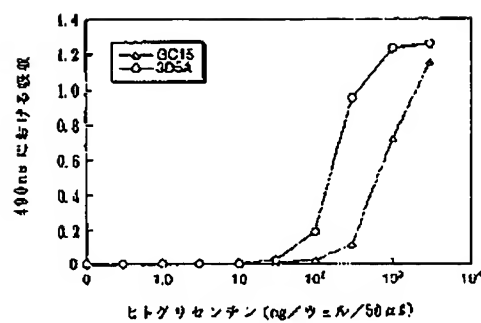
【図面の簡単な説明】

【図1】X軸に標準抗原濃度をとり、Y軸に(B-N)/(B₀-N)をとって得られた、本発明の抗ヒトグリセニン抗体を用いる標準抗原としての遺伝子組換えヒトグリセニンについての標準曲線を示す図である。

【図2】ヒトグリセニンのC末端領域を認識するモノクローナル抗体を固相化し、これにヒトグリセニン標本を反応させ、更にヒトグリセニンのN末端領域を認

(10)

特開平 8 - 1 8 3 7 9 9



 フロントページの続き

(51)Int.Cl. [°]	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53		F		
33/577		B		
// C 1 2 N 15/02				
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				